



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
 ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2003123534/13, 29.07.2003

(24) Дата начала действия патента: 29.07.2003

(45) Опубликовано: 20.04.2005 Бюл. № 11

(56) Список документов, цитированных в отчете о
 поиске: БИОХИМИЯ, 2002, 67 (11). JP
 2001285205, 19.09.2001. EP 1217068, 26.06.2002.

Адрес для переписки:

117871, Москва, В-437, ГСП-7, ул.
 Миклухо-Маклая, 16/10, ИБХ РАН, патентный
 отдел

(72) Автор(ы):

Липкин В.М. (RU),
 Шуваева Т.М. (RU),
 Радченко В.В. (RU),
 Меркулова М.И. (RU),
 Новоселов В.И. (RU),
 Фесенко Е.Е. (RU)

(73) Патентообладатель(ли):

Институт биоорганической химии им.
 академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова
 РАН (RU),
 Институт биофизики клетки РАН (RU)

(54) РЕКОМБИНАНТНАЯ ПЛАЗМИДНАЯ ДНК рЕТ23-a(+)/PrxVIhum Δ 178, КОДИРУЮЩАЯ
 N-КОНЦЕВОЙ ФРАГМЕНТ ПЕРОКСИРЕДОКСИНА VI ЧЕЛОВЕКА, И ШТАММ E.coli
 BL21/DE3/pET23-a(+)/PrxVIhum Δ 178 - ПРОДУЦЕНТ N-КОНЦЕВОГО ФРАГМЕНТА
 ПЕРОКСИРЕДОКСИНА VI ЧЕЛОВЕКА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии и генной инженерии и может быть использовано в фармацевтической промышленности. Сконструирована плазмидная ДНК рЕТ23-a(+)/PrxVIhum Δ 178 с молекулярной массой 19691, 61 Da, которая содержит промотор РНК-полимеразы T7, участок инициации репликации, генетический маркер, детерминирующий устойчивость трансформированных данной плазмидой клеток и ампициллину, и последовательность нуклеотидов, кодирующих N-концевой фрагмент

пероксиредоксина VI человека размером 177 аминокислотных остатков. Путем трансформации клеток E.coli плазмидной ДНК рЕТ23-a(+)/PrxVIhum Δ 178 получен штамм E.coli BL21/DE3/PeT23-a (+)/PrxVIhum Δ 178 - продуцент N-концевого фрагмента пероксиредоксина VI человека. Использование предложенного изобретения позволяет получить фрагмент пероксиредоксина VI человека, обладающий антиоксидантной активностью полноразмерного пероксиредоксина при пониженной молекулярной массе, что обеспечивает лучшую проникаемость в ткани. 2 н.п. ф-лы, 3 ил.

Структура *NdeI-EcoRI* – фрагмента длиной 552 п.о. с
 последовательностью, кодирующей N-концевой фрагмент PrxVI человека
PrxVIhumΔ178 и соответствующая ей аминокислотная последовательность.
 Подчёркнут сайт узнавания рестриктазой *EcoRI* . Иницирующий и
 терминирующий кодоны выделены жирным шрифтом.

M P G G L L L G D V A P N F E A N T T
ATGCCCGGAGGTCTGCTTCTCGGGGACGTGGCTCCCAACTTTGAGGCCAATACCACC
 TACGGGCCTCCAGACGAAGAGCCCCCTGCACCGAGGGTTGAAACTCCGGTTATGGTGG

V G R I R F H D F L G D S W G I L F S
 GTCGGCCGCATCCGTTTCCACGACTTTCTGGGAGACTCATGGGGCATTTCTTCTCTCC
 CAGCCGGCGTAGGCAAAGGTGCTGAAAGACCCCTCTGAGTACCCCGTAAGAGAAGAGG

H P R D F T P V C T T E L G R A A K L
 CACCCTCGGGACTTTACCCCAAGTGTGCACACAGAGCTTGGCAGAGCTGCAAAGCTG
 GTGGGAGCCCTGAAATGGGGTCACACGTGGTGTCTCGAACCGTCTCGACGTTTCGAC

A P E F A K R N V K L I A L S I D S V
 GCACCAGAATTTGCCAAGAGGAATGTTAAGTTGATTGCCCTTTCAATAGACAGTGTT
 CGTGGTCTTAAACGGTTCTCCTTACAATTCAACTAACGGGAAAGTTATCTGACACAA

E D H L A W S K D I N A Y N C E E P T
 GAGGACCATCTTGCCTGGAGCAAGGATATCAATGCTTACAATTGTGAAGAGCCCACA
 CTCCTGGTAGAACGGACCTCGTTCCTATAGTTACGAATGTTAACACTTCTCGGGTGT

E K L P F P I I D D R N R E L A I L L
 GAAAAGTTACCTTTTCCCATCATCGATGATAGGAATCGGGAGCTTGCCATCCTGTTG
 CTTTTCAATGGAAAAGGGTAGTAGCTACTATCCTTAGCCCTCGAACGGTAGGACAAC

G M L D P A E K D E K G M P V T A R V
 GGCATGCTGGATCCAGCAGAGAAGGATGAAAAGGGCATGCCTGTGACAGCTCGTGTG
 CCGTACGACCTAGGTCGTCTCTTCTACTTTTCCCGTACGGACACTGTCGAGCACTC

V F V F G P D K K L K L S I L Y P A T
 GTGTTTGTGTTTTGGTCCCTGATAAGAAGCTGAAGCTGTCTATCCTCTACCCAGCTACC
 CACAAACAAAAACCAGGACTATTCTTCGACTTCGACAGATAGGAGATGGGTGCGATGG

T G R N F D E I L R V V I S L Q L T A
 ACTGGCAGGAACCTTTGATGAGATTCTCAGGGTAGTCATCTCTCTCCAGCTGACAGCA
 TGACCGTCCTTGAAACTACTCTAAGAGTCCCATCAGTAGAGAGAGGTGCGACTGTCGT

E K R V A T #
 GAAAAAAGGGTTGCCACCT**TAAG**TTGAATTCGAAGGATGG
 CTTTTTTCCCAACGGTGGATTCAACTTAAGCTTCCTACC

Фиг. 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 2003123534/13, 29.07.2003

(24) Effective date for property rights: 29.07.2003

(45) Date of publication: 20.04.2005 Bull. 11

Mail address:

117871, Moskva, V-437, GSP-7, ul.
Miklukho-Maklaia, 16/10, IBKh RAN, patentnyi otdel

(72) Inventor(s):

Lipkin V.M. (RU),
Shuvaeva T.M. (RU),
Radchenko V.V. (RU),
Merkulova M.I. (RU),
Novoselov V.I. (RU),
Fesenko E.E. (RU)

(73) Proprietor(s):

Institut bioorganicheskoy khimii im. akademikov
M.M.Shemjakina i Ju.A.Ovchinnikova RAN (RU),
Institut biofiziki kletki RAN (RU)

(54) RECOMBINANT PLASMID DNA pET23-a(+)/PrxVIhum Δ 178, ENCODING N-TERMINAL FRAGMENT OF HUMAN PEROXIREDOXINE VI, AND E.coli STRAIN BL21/DE3/pET23-a(+)/PrxVIhum Δ 178 AS PRODUCER OF N-TERMINAL FRAGMENT OF HUMAN PEROXIREDOXINE VI

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, genetic engineering, pharmaceutical industry.

SUBSTANCE: plasmid DNA
pET23-a(+)/PrxVIhum Δ 178 with molecular weight of 19691.61 Da is constructed. DNA contains RNA-polymerase T7 promoter; replication initiation site; genetic marker which determinates resistance of cells transformed by said plasmid to ampicillin; and nucleotide sequence encoding N-terminal fragment of human peroxiredoxine VI containing 177 of amino acid residues. E.coli strain BL21/DE3/pET23-a(+)/PrxVIhum Δ 178 being producer of N-terminal fragment of human peroxiredoxine VI is obtained by transformation of E.coli cells with plasmid DNA pET23-a(+)/PrxVIhum Δ 178. Method of present invention makes it possible to obtain human peroxiredoxine VI fragment having reduced molecular weight, improved tissue permeability, and antioxidant activity of full-scale peroxiredoxine.

EFFECT: human peroxiredoxine VI fragment with improved tissue permeability.

2 cl, 3 dwg, 4 ex

Структура *NdeI-EcoRI* – фрагмента длиной 552 н.о. с последовательностью, кодирующей N-концевой фрагмент PrxVI человека PrxVI_{human}Δ178 и соответствующая ей аминокислотная последовательность. Подчёркнут сайт узнавания рестриктазы *EcoRI*. Иницирующий и терминирующий кодоны выделены жирным шрифтом.

M P G C L L L G D V A P N F E A N T T
ATGCCCGGAGGCTCTGCTTCTCGGGACGTGGCTCCCAACTTTAGGCCAATACCACC
TACGGGCTCCAGACGAAGAGCCCTGCACCGAGGGTGAACAATCCGGTTATGGTGG

V G R I R F H D F L G D S W G I L F S
GTGGGCGCATCCGTTTCCACGACTTCTGGGAGACTCATGGGGCAITCTCTTCTCC

H P R D F T P V C T T E L G R A A K L
CACCTCGGGACATTACCCAGTGTCACCACAGCTTGGCAGAGCTGCAAGCTG
GTGGGAGCCCTGAAAGGGGTACACGTGGTGTCTCGAACCCTCTCGAGCTTTCGAC

A P E F A K R N V K L I A L S I D S V
GCACCAGAAATTT3CCAAGAGGARTGTAAAGTTSATTGCCCTTTCAATAGACAGTGT
CGTGGCTTAACCGGTTCCTTACAACTCACTAACGGGAAGTTATCTGCACAA

EDHLAWSKDINAYNCEET
GAGGACCATCTTGCTGGAGCAAGGATATCAAGCTTACAATTGTGAAGAGCCACAC
CTCTGCTAGAACGAGCCTGGTCCATAGTACCAATGTTAACACTCTGGGTG

E K L P F P I I D D R N R E L A I L L
GAAAAGTTACCTTTTCCCATCATCGATGATAGGAAATCGGGAGCTTGCCATCTCTGTG
CTTTTCAATGGAAAAGGGTAGTAGCTACTATCTTAGCCCTCGAACGGTAGGACAAC

G M L D P A E K D E K G M P V T A R V
GGCATGCTGGATCCAGCAGAGAAGCATGAAAAGGCATGCGTCTGACAGCTCGTGTG
CCGTACCACTAGTGGTCTCTCTCCACTTTCCCGTACGGACACTGTCGAGCACTC

V E V F G P D K K L K L S I L Y P A T
GTGTTTGTTTGTGGTCTGATAGAGAGCTGAAGCTGCTATCTCTACCCAGCTACC
CATAAACAAAAACCAAGGACTATTCTTCGACTTCGACAGATAGAGATGGGGTCGATGG

T G R N F D E I L R V V I S L Q L T A
ACTGGCAGGAACITTTGATAGATTTCAGGGTAGTCATCTCTCTCCAGCTGACAGCA
TGACCGTCTTGAAGACTACTCTAAGAGTCCCATCAGTAGAGAAGGTCGACTGTCTGT

E K R V A T #
GAAAAAAGGTTGCCACCTAAGTTGAATTCGAAGGATGG
CTTCTTCCCAACGGTGGATTCAAGTTAAGCTTCC'ACU

Фиг. 1

Изобретение относится к области биотехнологии, генной инженерии и может быть использовано для получения антиоксидантного препарата пероксиредоксина, предназначенного для лечения заболеваний, связанных с окислительным стрессом.

Известно, что при неполном восстановлении молекулярного кислорода в процессе клеточного дыхания образуются активные формы кислорода - супероксидный анион радикал (O_2^-), перекись водорода (H_2O_2), гидроксильный радикал ($HO\cdot$), которые являются крайне токсичными для клеток. Аэробные организмы выработали защитные механизмы для обезвреживания этих веществ. Одним из таких защитных механизмов является восстановление активных форм кислорода в результате реакций, катализируемых ферментами - антиоксидантами. Эти белки играют важную роль в поддержании окислительно-восстановительного потенциала клетки. К ним относятся хорошо изученные антиоксиданты, такие как супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, а, кроме того, открытые в последнее десятилетие пероксиредоксины [Chae H.Z., Robison K., Poole L.B., Church G., Storz G., and Rhee S.G. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 7017-7021].

Пероксиредоксины - новое семейство белков, которое в настоящее время насчитывает более 100 представителей, обнаруженных во всех живых организмах от археобактерий до человека и являющихся тиоловыми пероксидазами [Lee S.P., Hwang Y.S., Kim Y.J., Kwon K.S., Kim H.J., Kim K., Chae H.Z. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 29826-29832].

У млекопитающих выявлено 6 типов пероксиредоксинов, различающихся по аминокислотной последовательности, механизму действия и локализации в организме и в клетке. Все пероксиредоксины в своей последовательности содержат высоко консервативный участок, являющийся активным центром ферментов, в состав которого входят один или два остатка Cys. В тестах *in vitro* было показано, что пероксиредоксины предотвращают инактивацию глутаминсинтетазы в присутствии Fe^{3+} , O_2 и дитиотреитол (ДТТ) - модельной окислительной системе, генерирующей свободные радикалы [Kim K., Kim I.H., Lee K.Y., Rhee S.G., Stadtman E.R. (1988) *J. Biol. Chem.*, 263, 4704-4711].

К настоящему времени 1-Cys пероксиредоксин (пероксиредоксин VI, PrxVI) идентифицирован во многих органах и тканях млекопитающих. Первые природные индивидуальные белковые препараты PrxVI млекопитающих были выделены из обонятельного эпителия [Peshenko I.V., Novoselov V.I., Evdokimov V.A., Nikolaev Yu.V., Shuvaeva T.M., Lipkin V.M., Fesenko E.E. (1996) *FEBS Letters*, 381, 12-14] и легких крысы [Kim T.S., Sundaresh C.G., Feinstein S.I., Dodia C., Skach W.R., Jain M.R., Nagase T., Seki N., Isherawa K., Nomura N., Fisher A.B. (1997) *J. Biol. Chem.*, 272, 2542-2550]. Эти способы включают в себя накопление и гомогенизацию ткани, экстракцию целевого белка, а также тонкое фракционирование препарата с помощью трех последовательных хроматографических стадий. И хотя ткани, непосредственно контактирующие с кислородом воздуха, наиболее обогащены PrxVI [Novoselov S.V., Peshenko I.V., Popov V.I., Novoselov V.I., Bystrova M.F., Evdokimov V.J., Kamzalov S.S., Merkulova M.I., Shuvaeva T.M., Lipkin V.M., Fesenko E.E. (1999) *Cell Tissue Res.*, 298, 471-480], эти трудоемкие и промышленно невоспроизводимые способы имеют лишь теоретическое значение. Основными недостатками получения PrxVI из природных источников являются: необходимость накопления животных тканей, малый конечный выход чистого препарата (0,01 мг на одно животное) и возможность возникновения аллергических реакций при использовании чужеродного белка для лечения человека.

В настоящее время препаративные количества PrxVI млекопитающих получают более предпочтительными генноинженерными методами, позволяющими нарабатывать нужные количества однородного генетического материала (выбранного вектора, соединенного со структурным геном полипептида) и, как следствие, конечного продукта - белка.

Так, в клетках штамма *E. coli* BL21 (DE3) был осуществлен биосинтез полноразмерного рекомбинантного PrxVI человека (PrxVIhum) [Chen L.-W., Dodia C., Feinstein S.I., Jain M.K., Fisher A.B. (2000) *J. Biol. Chem.*, 275, 28421-28427]. Для этого был взят фрагмент кДНК PrxVIhum (PrxVIhum) HA0683 (GenBank™ D14662) длиной 1653 п.о., содержащий открытую рамку считывания для PrxVIhum (224 а.о.) размером 672 п.о. Большая часть исходного

фрагмента (длиной 1044 п.о.) была встроена в экспрессирующий вектор рЕТ28с по сайту рестрикции HindIII. Полученная конструкция обеспечивала наработку рекомбинантного белка, который, наряду с аминокислотной последовательностью PrxVIhum, содержал 42 дополнительных аминокислотных остатка, включая шесть остатков His на N-конце полипептидной цепи белка. Взяв за основу тот же фрагмент-PrxVIhum и искусственно введя сайты для узнавания рестриктаз NdeI и XhoI, авторы амплифицировали кодирующую область. Полученный фрагмент был клонирован по этим сайтам в экспрессирующий вектор рЕТ21b. В результате рекомбинантный белок, биосинтез которого детерминировала эта плазмида, содержал только два дополнительных аминокислотных остатка, помимо шести остатков His на С-конце полипептидной цепи продукта. После трансформации *E. coli* полученными рекомбинантными ДНК и индукции экспрессии генов изопропилтиогалактозидом (ИПТГ) клетки наращивали в течение 6 ч и разрушали; белковые препараты подвергали последовательной очистке хроматографическими методами. К недостаткам обоих полученных продуктов можно отнести то, что, хотя и введение в состав полипептидной цепи дополнительных остатков His значительно упрощает выделение рекомбинантных белков, такого рода модификации заметно смещают изоэлектрическую точку белковых продуктов по сравнению с природным и, как следствие, меняют их электростатическое микроокружение. Кроме того, введение дополнительных аминокислотных остатков (42-х в первой конструкции и 2-х - во второй) увеличивает молекулярную массу продукта и, как следствие, ухудшает его проникновение в клетку.

Экспрессия рекомбинантного PrxVI была осуществлена также в бакуловирусной системе [Fujii T., Fujii J., Taniguchi N. (2001) *Eur. J. Biochem.*, 268, 218-224]. Для этого из различных тканей крысы была выделена смесь мРНК, по которой обратной полимеразной реакцией синтезировали комплементарную цепь ДНК. Затем эту кДНК субклонировали в бакуловирусный челночный вектор рVL1392. Полученная конструкция обеспечивала наработку полноразмерного PrxVI крысы при инфекции эукариотических клеток Sf21. С помощью высаживания, фракционированием на ионообменной смоле с последующими стадиями гель-фильтрации функционально активный рекомбинантный белок был выделен из культуральной жидкости этих клеток. К недостаткам этого метода можно отнести длительность получения (5 дней) препарата, необходимость использования дорогостоящих питательных сред, невысокий по сравнению с бактериальными системами выход целевого продукта и возможность возникновения побочных аллергических реакций при использовании в лекарственных композициях крысиного PrxVI.

Наиболее близким по технической сущности к предлагаемому изобретению является полипептид массой 25034 Да, представляющий собой полноразмерный рекомбинантный PrxVIhum и кодирующая его рекомбинантная плазмидная ДНК рЕТ23-а(+)/PrxVIhum [Меркулова М.И., Шуваева Т.М., Радченко В.В., Янин В.А., Бондарь А.А., Софин А.Д., Липкин В.М. (2002) *Биохимия*, 67, 1496-1501]. Получаемый пероксиредоксин обладает высокой антиоксидантной активностью. Однако высокая молекулярная масса, препятствующая проникновению молекулы антиоксиданта в клетки организма человека, ограничивает его применение.

Задачей предлагаемого изобретения является конструирование плазмиды, детерминирующей синтез укороченного полипептида PrxVIhum, сохраняющего антиоксидантную активность полноразмерного PrxVIhum, а также создание высокопродуктивного штамма-производителя для получения полипептида пероксиредоксина человека VI, являющегося N-концевым фрагментом PrxVIhum.

Поставленная задача решается за счет конструирования рекомбинантной плазмидной ДНК рЕТ23-а(+)/PrxVIhum Δ 178, кодирующей N-концевой фрагмент пероксиредоксина VI человека с молекулярной массой 19691,61 Да, содержащей EcoRI-NdeI-фрагмент плазмиды рЕТ23-а(+), включающий промотор РНК-полимеразы фага Т7, участок инициации репликации (ori) и терминатор транскрипции рибосомального оперона *E.coli*, NdeI-EcoRI - фрагмент гена PrxVIhum длиной 552 п.о., кодирующий PrxVIhum Δ 178, генетический маркер - Ар, детерминирующий устойчивость трансформированных плазмидой

pET23-a(+)/PrxVlhum Δ 178 клеток E.coli к ампициллину, уникальные сайты узнавания рестрикционными эндонуклеазами со следующими координатами: NdeI-790, EcoRI-192, PvuII-1531, а также за счет штамма E. coli BL21/DE3/pET23-a(+)/PrxVlhum Δ 178- продуцента N-концевого фрагмента пероксиредоксина VI человека, обеспечивающего синтез N-концевого фрагмента PrxVlhum размером 177 аминокислотных остатков (PrxVlhum Δ 178) с уровнем экспрессии в 30% от суммарного клеточного белка (30 мг/л культуральной жидкости).

Преимуществом заявленного технического решения является возможность получения антиоксиданта - пероксиредоксина VI человека с сохранением антиоксидантной активности полноразмерного пероксиредоксина при пониженной молекулярной массе, что обеспечивает проникновение препарата в клетки организма человека.

Исходной плазмидой для конструирования новой последовательности ДНК, кодирующей полипептид PrxVlhum Δ 178, служит плазида pET23-a(+)/PrxVlhum, детерминирующая экспрессию полноразмерного рекомбинантного PrxVlhum. Эту плазмиду конструируют на основе векторной плазмиды pET23-a(+)[Studier F.W., Moffatt, B.A. (1986) J. Mol. Biol., 189, 113-130]. Фрагмент PrxVlhum, предназначенный для клонирования с сохранением рамки считывания в экспрессирующем векторе, получают методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) [Taylor G. In: Polymerase Chain Reaction. A Practical Approach, v.1, McPherson M.J., Quirke P., Taylor G. R. eds. Oxford Univ. Press. Oxford. 1994] с использованием в качестве праймеров олигонуклеотидов, в последовательности которых введены точечные замены для создания соответствующих участков рестрикции. В качестве прямого праймера используют 5'-ATCACCGTCATATGCCCGGAGG-3' (подчеркнут сайт узнавания рестриктазы NdeI), в качестве обратного -5'-CCAGAATTC TTAAGGCTGGGGTGTG-3' (подчеркнут участок узнавания рестриктазы EcoRI). В качестве матрицы для проведения ПЦР используют плазмиду, содержащую последовательность PrxVlhum HA0683

(GenBank™ D 14662). Реакционная смесь для проведения ПЦР содержит (в объеме 50 мкл): 1 нг плазмидной ДНК, 20 пмоль каждого праймера, 5 мкл буфера для ПЦР фирмы "Promega", 200 мкМ каждого dNTP, 5 единиц Taq-полимеразы. Реакцию начинают со стадии предварительной денатурации ДНК - 94°C, 5 мин, затем проводят 30 циклов ПЦР при следующих параметрах температурного цикла: денатурация - 30 с при 94 °C, отжиг с праймерами - 30 с при 60°C, элонгация - 45 с при 72 °C с последующей инкубацией при 72 °C в течение 5 мин. После обработки продукта реакции соответствующими рестриктазами PrxVlhum клонируют в плазмиду pET23-a(+) по сайтам NdeI-EcoRI.

Рекомбинантная плазмидная ДНК pET23-a(+)/PrxVlhum Δ 178 характеризуется следующими признаками:

имеет размер 4210 п.о.

кодирует N-концевой фрагмент PrxVlhum длиной 177 а.о.

состоит из EcoRI-NdeI-фрагмента плазмиды pET23-a(+), включающего промотор РНК-полимеразы фага T7, участок инициации репликации (ori) и терминатор транскрипции рибосомального оперона E.coli, NdeI-EcoRI-фрагмента длиной 552 п.о. с последовательностью, кодирующей PrxVlhum Δ 178.

содержит генетический маркер - Ap, детерминирующий устойчивость трансформированных плазмидой pET23-a(+)/PrxVlhum Δ 178 клеток E.coli к ампициллину, а также уникальные сайты узнавания рестрикционными эндонуклеазами со следующими координатами: NdeI-790, EcoRI-192, PvuII-1531.

Преимущества предложенной конструкции достигаются за счет того, что входящий в ее состав фрагмент PrxVlhum Δ 178 кодирует укороченный по сравнению с PrxVlhum полипептид, сохраняющий антиоксидантную активность природного белка. Это, во-первых, упрощает хроматографическую очистку PrxVlhum Δ 178; во-вторых, делает более технологичным его использование в составе лечебных композиций за счет лучшей проницаемости в ткани и увеличения времени циркуляции с биологическими жидкостями по

сравнению с полноразмерным белком; в-третьих, увеличивает долю целевого продукта в общей биомассе штамма-продуцента, что в свою очередь ведет к снижению себестоимости конечного продукта.

Для получения штамма-продуцента полипептида PrxVIhum Δ 178 компетентные клетки *E. coli* BL21/DE3 трансформируют рекомбинантной плазмидной ДНК рЕТ23-а(+)/PrxVIhum Δ 178.

Полученный штамм *E. coli* BL21/DE3/рЕТ23-а(+)/PrxVIhum Δ 178 характеризуется следующими признаками.

Морфологические признаки: клетки мелкие палочковидной формы, граммотрицательные, неспороносные, 1×3,5 мкм, подвижные.

Культуральные признаки: при росте на агаризованной среде LB колонии круглые, гладкие, полупрозрачные, блестящие, серые. Край ровный, диаметр колоний 1-3 мм, консистенция пастообразная. Рост в жидких средах (LB, минимальная среда с глюкозой) характеризуется ровным помутнением, осадок легко седиментирует.

Физико-биохимические признаки: клетки растут при 4-42°C, оптимум pH 6,8-7,6. В качестве источника азота используют как минеральные соли азота, так и органические соединения: аминокислоты, пептон, триптон, дрожжевой экстракт. В качестве источника углерода при росте на минимальной среде используют глицерин, углеводы, аминокислоты.

Устойчивость к антибиотикам: клетки штамма-продуцента проявляют устойчивость к ампициллину (до 300 мг/мл), обусловленную наличием в плазмиде гена β -лактамазы (bla).

На фиг.1 представлена нуклеотидная последовательность NdeI-EcoRI-фрагмента плазмиды рЕТ23-а(+)/PrxVIhum Δ 178 и кодируемая им аминокислотная последовательность полипептида PrxVIhum Δ 178; на фиг.2 - физическая карта полученной плазмиды; на фиг.3 - результаты сравнительного исследования протекторных свойств рекомбинантного полноразмерного PrxVI человека и его N-концевого фрагмента (PrxVIhum Δ 178) по защите глутаминсинтетазы *E.coli* от инактивации в модельной окислительной системе *in vitro*.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. Конструирование рекомбинантной плазмидной ДНК рЕТ23-а(+)/PrxVIhum Δ 178, кодирующей N-концевой фрагмент Prx VI человека. Используют фрагмент кДНК Prx VI человека, который ранее был клонирован с сохранением рамки считывания в экспрессирующем векторе [Меркулова М.И., Шуваева Т.М., Радченко В.В., Янин В.А., Бондарь А.А., Софин А.Д., Липкин В.М.(2002) Биохимия, 67, 1496-1501]. Этот вектор, рЕТ23-а(+)/PrxVIhum, используют в качестве матрицы для ПЦР. Полученный таким образом фрагмент ДНК кодирует N-концевой фрагмент Prx VI длиной 177 аминокислотных остатков. В качестве прямого праймера на этой стадии используют 5'-GCG AAA TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG -3' (комплементарный промоторной области вектора рЕТ23-а(+)/PrxVIhum). В качестве обратного для PrxVI Δ 178 - 5'-CCA TCC TTC GAA TTC AAC TTA GGT GGC-3' (подчеркнут сайт рестриктазы EcoRI, выделен стоп-кодон). Реакционная смесь содержит (в объеме 50 мкл): ~1 нг плазмидной ДНК, 20 пмоль каждого праймера, 5 мкл буфера для ПЦР ("Promega", США), 200 мкМ каждого dNTP, 5 единиц Taq-полимеразы. Реакцию начинают с предварительной денатурации ДНК при 94 °C в течение 3 мин, затем проводят 10 циклов ПЦР при следующих параметрах температурного цикла: денатурация - 30 с при 94°C, отжиг с праймерами - 30 с при 55°C, элонгация - 45 с при 72°C, затем еще 10 циклов реакции: денатурация - 30 с при 94°C, отжиг с праймерами - 30 с при 62°C, элонгация - 45 с при 72°C с последующей инкубацией при 72°C в течение 5 мин. После обработки соответствующими рестриктазами фрагмент PrxVIhum Δ 178 лигируют с NdeI-EcoRI-фрагментом плазмиды рЕТ23-а(+) с использованием ДНК-лигазы фага T4. Точность сборки конструкции проверяют рестрикционным анализом и секвенированием полученной вставки по модифицированному методу Сенгера [Чемерис А.В., Ахунов Э.Д., Вахитов В.А. Секвенирование ДНК, М., "Наука", 1999]. На фиг.2 представлена физическая карта рекомбинантной плазмиды рЕТ23-а(+)/PrxVIhum Δ 178.

Пример 2. Экспрессия PrxVIhum Δ 178-фрагмента кДНК PrxVI человека. Для экспрессии фрагмента PrxVIhum в качестве штамма-хозяина выбирают штамм E.coli BL-21(DE-3), несущий в хромосоме ген РНК-полимеразы фага Т7 под контролем индуцибельного lac-промотора [Studier F.W., Moffatt B.A. (1986) J. Mol. Biol., 189, 113-130]. Трансформацию компетентных клеток E.coli BL-21(DE-3) осуществляют химическим методом с использованием хлорида кальция [Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. (1989) Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.-Y.]. Для наработки рекомбинантного белка клетки выращивают при 37°C до достижения в жидкой культуре значения поглощения $A_{600} 0,6$. Затем для индукции экспрессии белков добавляют индуктор lac-промотора ИПТГ до конечной концентрации 0,4 мМ и продолжают инкубацию еще 5 ч. После этого суспензию клеток подвергают центрифугированию. Осадок, содержащий клетки штамма-продуцента, разрушают ультразвуком и повторно центрифугируют. Белковую фракцию, содержащую в своем составе целевой продукт, высаживают насыщенным раствором $(NH_4)_2SO_4$ и диализуют против 12 мМ Трис-НСl буфера (pH 7,8), в состав которого входят 1 мМ $MgCl_2$ и 1 мМ ДДТ. Белковую смесь хроматографируют на ДЭАЭ-сефарозе в градиенте хлорида натрия. Фракции, содержащие целевой полипептид, подвергают дальнейшей очистке с помощью гель-фильтрации на сефакириле S-200 и анализируют с помощью полиакриламидного гель-электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия.

Пример 3. Сравнение протекторных свойств рекомбинантного полноразмерного PrxVIhum и его N-концевого фрагмента PrxVIhum Δ 178 по защите глутаминсинтетазы E. coli от инактивации в модельной окислительной системе in vitro.

Глутаминсинтетазу выделяют из клеток E.coli штамма DH5 α [Streicher S.L., Tyler B. (1980) J. Bacteriol., 142, 69-78] и инактивируют в присутствии Fe^{3+} , O_2 и ДТТ - в модельной окислительной системе, генерирующей свободные радикалы [Kim K., Kim I.H., Lee K.Y., Rhee S.G., Stadtman E.R. (1988) J. Biol. Chem., 263, 4704-4711]. Реакцию инактивации глутаминсинтетазы проводят в объеме 60 мкл реакционной смеси, содержащей 5 мкг фермента, 50 мМ Hepes (pH 7,4), 3 мМ ДТТ и 3 мМ $FeCl_3$, в присутствии разных концентраций пероксиредоксина в течение 10 мин при 37°C. Затем определяют оставшуюся активность глутаминсинтетазы E.coli. Протекторные свойства пероксиредоксина по защите глутаминсинтетазы E.coli от инактивации определяют как отношение оставшейся активности фермента после инактивации в присутствии разных концентраций пероксиредоксина к активности неинактивированной глутаминсинтетазы. Результаты теста представлены на фиг.3.

Пример 4. Определение продуктивности штамма-продуцента PrxVIhum Δ 178.

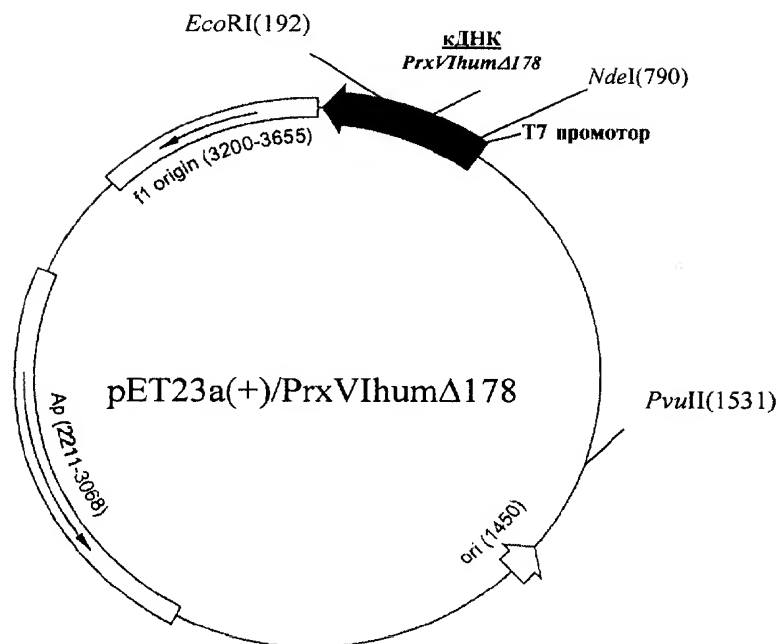
С целью улучшения аэрации в 5 мл жидкой среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, вносят индивидуальную колонию клеток E.coli BL21/DE3, содержащую сконструированную плазмиду pET23-a(+)/PrxVIhum Δ 178.

Выращивают при 37°C на качалке при 180 об/мин в течение 2,5 ч до достижения в жидкой культуре значения поглощения $A_{600} 0,6$. Затем добавляют ИПТГ до концентрации 0,4 мМ и продолжают инкубацию в тех же условиях в течение 6 ч. Отбирают пробу 1 мл и центрифугируют 5 мин при 6000 об/мин, после чего клетки суспендируют в 100 мкл буфера, содержащего 125 мМ Трис-НСl (pH 6,8), 20% глицерина, 3% додецилсульфата натрия и 0,01% бромфенолового синего. Клеточную суспензию прогревают 10 мин на кипящей водяной бане. Отбирают образцы 2,5 мкл, 5 мкл, 7,5 мкл, 10 мкл и 15 мкл и анализируют электрофорезом в 15%-ном полиакриламидном геле, содержащем 0,1% додецилсульфата натрия [Laemmli U.K. (1970) Nature, 227, 680-687]. Гель окрашивают Кумасси R-250 и сканируют на лазерном денситометре Ultrascan XL. По данным сканирования полипептид PrxVIhum Δ 178 составлял 30% суммарного клеточного белка, что соответствует выходу конечного чистого белкового продукта 30 мг/л культуры клеток.

Формула изобретения

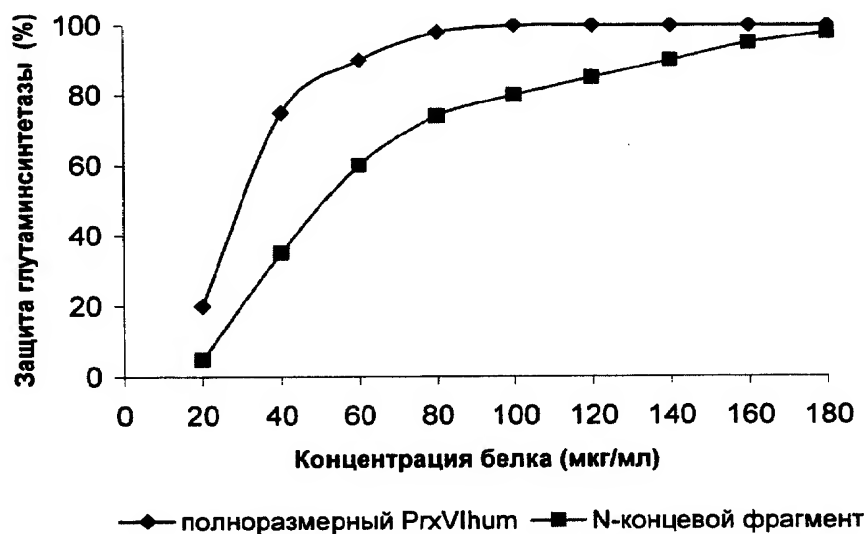
1. Рекомбинантная плазмидная ДНК рЕТ23-а(+)/PrxVIhum Δ 178, кодирующая N-концевой фрагмент пероксиредоксина VI человека, с молекулярной массой 19691,61 Да, содержащая EcoRI - NdeI-фрагмент плазмиды рЕТ23-а(+), включающий промотор РНК-полимеразы фага Т7, участок инициации репликации (ori), генетический маркер (Ap), детерминирующий устойчивость трансформированных плазмидой рЕТ23-а(+)/PrxVIhum Δ 178 клеток E.coli к ампициллину, уникальные сайты узнавания рестрикционными эндонуклеазами со следующими координатами: NdeI-790, EcoRI-192, PvuII-1531, и NdeI - EcoRI-фрагмент гена PrxVIhum длиной 552 п.о., кодирующий PrxVIhum Δ 178.

2. Штамм E.coli BL21/DE3/рЕТ23-а(+)/PrxVIhum Δ 178 - продуцент N-концевого фрагмента пероксиредоксина VI человека.



Физическая карта рекомбинантной плазмиды pET23-a(+)/*PrxVIhumΔ178*. Указаны сайты эндонуклеаз рестрикции. Ori – участок инициации репликации плазмиды. Ap^r – генетический маркер, детерминирующий устойчивость трансформированных плазмидой pET23-a(+)/*PrxVIhumΔ178* клеток *E. coli* к ампициллину.

Фиг. 2



Сравнение протекторных свойств полноразмерного рекомбинантного пероксиредоксина VI человека (*PrxVIhum*) и его N-концевого фрагмента *PrxVIhumΔ178* по защите глутаминсинтетазы *E. coli* от инактивации в модельной окислительной системе *in vitro*.

Фиг. 3